

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

AOYAMA, Tamotsu
Aoyama & Partners
IMP Building
3-7, Shiromi 1-chome
Chuo-ku, Osaka-shi
Osaka 540-0001
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 03 November 1999 (03.11.99)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 661202	
International application No. PCT/JP99/00638	International filing date (day/month/year) 15 February 1999 (15.02.99)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant
 ☐ the inventor
 ☐ the agent
 ☐ the common representative

Name and Address

State of Nationality

State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person
 ☐ the name
 ☐ the address
 ☐ the nationality
 ☐ the residence

Name and Address

KOWA COMPANY, LTD.
6-29, Nishiki 3-chome
Naka-ku
Nagoya-shi
Aichi 460-0003
Japan

State of Nationality

JP

State of Residence

JP

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

The applicant identified in Box 2 should be included on the record as an additional applicant for EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), AU, CA, CN, KR

4. A copy of this notification has been sent to:

<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned
<input checked="" type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Masashi HONDA Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing:

21 October 1999 (21.10.99)

International application No.:

PCT/JP99/00638

Applicant's or agent's file reference:

661202

International filing date:

15 February 1999 (15.02.99)

Priority date:

15 February 1998 (15.02.98)

Applicant:

SASAKI, Takumi et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

03 August 1999 (03.08.99)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was



was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

J. Zahra

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

6T
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 661202	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/00638	International filing date (day/month/year) 15 February 1999 (15.02.99)	Priority date (day/month/year) 15 February 1998 (15.02.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 39/09, 38/16 A61P 37/06, 29/00, 1/00, 37/08 // C12N 15/09, C07K 14/315		
Applicant JURIDICAL FOUNDATION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>

Date of submission of the demand 03 August 1999 (03.08.99)	Date of completion of this report 12 April 2000 (12.04.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/00638

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/00638

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-13	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-13	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-13	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Document 1 [JP, 9-110704, A (Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute), 28 April, 1997 (28.04.97); (Family: none); entire document] discloses preventives/remedies for immunopathy that contain as their active ingredient natural *Staphylococcus aureus* enterotoxin B (SEB), which interacts with the T cell receptor (TCR) specific V β component, but there are no disclosures concerning the inventions of claims 1-12, namely the preventives/remedies for immunopathy that contain as their active ingredient modified forms of SEB wherein at least one of the amino acid residues in the SEB amino acid sequence has been substituted or derivatives thereof, where said modified forms or derivatives have the effect of inhibiting the activation of T cells, and thus reducing only the immunological responsiveness to SEB, without causing the elimination of T cells that have the specific V β component that is induced by natural SEB or recombinant wild SEB. However, document 2 [JP, 8-500328, A (National Jewish Center for Immunology and Respiratory Medicine), 16 January, 1996 (16.01.96); & WO, 93/14631, A1 & EP, 626805, A; Abstract; Claims; Summary of the Invention; page 16, line 23 to page 18, line 5] discloses therapeutic use of SEB where its toxicity is avoided, and document 3 [Mutations Defining Functional Regions of the Superantigen Staphylococcal Enterotoxin B, (KAPPLER, John W. et al.), J. Exp. Med., 1992, Vol. 175, pages 387-396; Summary; Figs. 2, 4, 5, 6] discloses modified forms of SEB wherein at least one of the amino acid residues in the SEB amino acid sequence has been substituted or derivatives thereof, for which cytokine production is suppressed, i.e. the toxicity of SEB is avoided. It is thus considered that, in the case of the preventives/remedies for immunopathy disclosed in document 1, it would be easy for a person skilled in the art to 1) use preventives/remedies that avoid the toxicity of SEB in line with the disclosures in document 2, 2) use, in such preventives/remedies that avoid the toxicity of SEB, for example modified forms of SEB wherein at least one of the amino acid residues in the SEB amino acid sequence has been substituted or derivatives thereof as disclosed in document 3, and 3) verify that said toxicity is avoided due to an effect whereby the activation of T cells is inhibited, and thus only the immunological responsiveness to SEB is reduced, with the elimination of T cells that have the specific V β component that is induced by natural SEB or recombinant wild SEB not being induced.

Accordingly, the subject matter of claims 1-13 is considered not to involve an inventive step.

THIS PAGE BLANK (USPTO)



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 A61K 39/09, 38/16 // C12N 15/09, C07K 14/315</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/40935</p> <p>(43) 国際公開日 1999年8月19日(19.08.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/00638</p> <p>(22) 国際出願日 1999年2月15日(15.02.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/50137 1998年2月15日(15.02.98)</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 財団法人 化学及血清療法研究所 (JURIDICAL FOUNDATION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE)[JP/JP] 〒860-8568 熊本県熊本市大窪一丁目6番1号 Kumamoto, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ) 佐々木巧(SASAKI, Takumi)[JP/JP] 〒862-8014 熊本県熊本市石原町301-72 Kumamoto, (JP) 来海和彦(KIMACHI, Kazuhiko)[JP/JP] 〒862-8002 熊本県熊本市龍田町弓削908-121 Kumamoto, (JP) 副島見事(SOEJIMA, Kenji)[JP/JP] 〒862-8004 熊本県熊本市龍田町上立田1265-4 雇用促進住宅1-407 Kumamoto, (JP)</p>		<p>木村由美(KIMURA, Yumi)[JP/JP] 〒869-1101 熊本県菊池郡菊陽町津久礼3020 大川ハイツ201 Kumamoto, (JP) 野崎周英(NOZAKI, Chikateru)[JP/JP] 〒862-8001 熊本県熊本市武蔵ヶ丘5丁目26-1 Kumamoto, (JP) 藤山佳秀(FUJIYAMA, Yoshihide)[JP/JP] 〒520-0865 滋賀県大津市南郷2丁目41-22 Shiga, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 青山 稔, 外(AOYAMA, Tamotsu et al.) 〒540-0001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル 青山特許事務所 Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AU, CA, CN, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54) Title: NOVEL PREVENTIVES/REMEDIES FOR IMMUNOPATHY</p> <p>(54) 発明の名称 新規な免疫異常性疾患予防・治療用剤</p> <p>(57) Abstract Preventives/remedies for immunopathy which contain as the active ingredient modifications of natural <i>Staphylococcus aureus</i> enterotoxin B (SEB), wherein at least one of the amino acid residues in the amino acid sequence of SEB has been substituted, or derivatives thereof, characterized in that these modifications or derivatives thereof have an effect of inhibiting the activation of T cells by undergoing interactions with the specific Vβg(b) component of T cell receptor (TCR) but not causing the elimination of T cells having the specific Vβg(b) component induced by natural SEB or recombinant wild SEB, thus exclusively depressing the immunological response to SEB.</p>		

天然型の黄色ブドウ球菌腸管内毒素B (SEB) のアミノ酸配列において少なくとも1のアミノ酸残基の置換を有するSEB改変体またはその誘導体を有効成分として含有する免疫異常性疾患予防・治療用剤であって、該改変体または該誘導体は、T細胞レセプター (TCR) の特異的V β 成分と相互作用するが、天然型SEBや組換え野生型SEBによって惹起される特定のV β 成分をもつT細胞の除去を誘導することなくSEBに対する免疫学的応答性のみを低下させるT細胞活性化の抑制作用を有するものであることを特徴とする、免疫異常性疾患予防・治療用剤。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール
AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TR	トルコ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ			TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	ML	マリ	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
CA	カナダ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	US	米国
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CG	コンゴ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	VN	ヴェトナム
CH	スイス	IN	インド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラビア
CI	コートジボアール	IS	アイスランド	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CM	カメルーン	IT	イタリア	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CN	中国	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CU	キューバ	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CY	キプロス	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CZ	チェコ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	KR	韓国	RU	ロシア		
DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
EE	エストニア	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		

明 細 書

新規な免疫異常性疾患予防・治療用剤

技術分野

本発明は、新規な免疫異常性疾患の予防・治療用剤に関する。さらに詳細には、
5 スーパー抗原の一つとして知られる天然型の黄色ブドウ球菌腸管内毒素B

(Staphylococcal enterotoxin B ; 以下、SEBと呼称することもある) の改
変体またはその誘導体を有効成分として含有する慢性関節リウマチ、アレルギー
性疾患等の免疫異常性疾患の予防・治療用剤に関する。

背景技術

10 自己免疫疾患は、慢性関節リウマチ (Rheumatoid arthritis ; 以下、RAと呼
称することがある) 等の臓器非特異的自己免疫疾患と潰瘍性大腸炎等の臓器特異
的自己免疫疾患とに大きく分けられるが、通常は免疫学的寛容の状態にある自己
の抗原に対して応答するT細胞が、何らかの原因で自己の組織内で活性化され自
己の抗原と応答するようになり、これが持続的な炎症反応となって組織に障害を
15 与えることに起因するものである。その場合の自己の抗原とは、それぞれ自己の
関節の成分であるI型コラーゲンや消化管粘膜の主成分である。

これら疾患の患者数は毎年、僅かながら増加しているにも拘わらず、今なお有
効な治療薬や予防方法は見出されていない (山村雄一、岸本忠三、ロバート・
A・グッド編：薬剤による免疫不全、「免疫科学」、9巻、p. 285-289、
20 (1984))。現在、これらの疾患の治療には、サラゾピリン、5-アミノサ
リチル酸、アザチオプリン、6-MP、トラニラスト、メトトレキシサート、シ
クロスポリンA、メトロダニゾールの投与およびγS-免疫グロブリンの大量投
与等の薬物療法や胸腺摘出術、人工関節への置換術等の外科的療法、さらには栄
養療法等の対症療法が行われている (市川陽一ら：慢性関節リウマチにおけるメ
25 トトレキシサートおよびサラゾスルファピリジン長期投与例の検討、リウマチ、3
5巻、p. 663-670、(1995) ; 柏崎禎夫：慢性関節リウマチに対す
るオーラノフィンとメトトレキシサートによる併用療法の検討、リウマチ、36
巻、p. 528-544、(1996) ; 古谷武文ら：慢性関節リウマチにおけ
る低用量メトトレキシレート療法の有害事象、リウマチ、36巻、p. 746-

752、(1996) ; 渡辺言夫 : 若年性関節リウマチの薬物療法、リウマチ、
36巻、p. 670-675、(1996) ; 八倉隆保 : 免疫抑制療法・自己免疫
疾患の治療 総合臨床、30巻、p. 3358、(1981) ; 都外川新ら : 慢
性関節リウマチにおけるメトトレキシサート療法の検討—有効性のより高い投与
法を求めて—、リウマチ、37巻、p. 681-687 (1997))。しかし
ながら、これらは根治的な療法とはいえず、むしろ長期服用によるため重篤な副
作用の原因ともなり、より有効な予防・治療薬、治療法の開発が望まれている。

SEBは周知のように細菌性スーパー抗原の一種である (White J. et. al.
Cell, Vol. 56, p. 27-35, 1989)。通常の抗原はクラスII主要組織
適合遺伝子複合体 (Major Histocompatibility Complex : 以下、MHCと呼称す
ることもある) と複合体を形成した状態でT細胞上のT細胞抗原受容体 (T cell
antigen receptor : 以下、TCRと呼称することもある) に認識され、しかもそ
の認識はクラスII MHCのハプロタイプに限定される (これをMHC拘束性とい
う)。これに対して、スーパー抗原はクラスII MHC分子にハプロタイプに
関係なく結合し、さらに特定のTCRのβ鎖可変領域 (Vβ鎖) に結合する。こ
のような結合が生じると、スーパー抗原が結合したT細胞は一時的に活性化され
分裂増殖を引き起こし、炎症性のサイトカインを産生する (Micusan V.V. &
Thibodean J, Seminars in Immunology, Vol. 5, p. 3-11, 1993)。

SEBは食中毒を起こす毒素の一つであるが、食中毒様の症状はSEBを動物
に静脈内投与しても認められることからSEBの上記生物活性を介して、毒性が
発現されていることが示唆される (Micusan V.V. & Thibodean J, Seminars in
Immunology, Vol. 5, p. 3-11, 1993)。

ところが、スーパー抗原を新生マウスに静脈内或いは腹腔内に投与すると、こ
れに応答するVβ鎖 (SEBではVβ7及びVβ8 TCR) を持ったT細胞亜集
団は除去され、同じ抗原に対して応答しなくなる免疫寛容の状態になる (White
J. et. al. Cell, Vol. 56, p. 27-35, 1989)。一方、SEBを成体の
マウスに投与した場合は、前述のような一時的な活性化の後に応答性のVβ7、
Vβ8 TCRを持つT細胞亜集団は、再度のSEBの刺激に対して応答しなくな
る状態、即ちアナジーの状態が誘導されて免疫寛容になる。SEBがこのような

活性を有することから、前述の慢性関節リウマチや潰瘍性大腸炎のような難治性の自己免疫疾患、さらには免疫異常性疾患の予防・治療用薬剤になる可能性が示唆されている（特開平9-110704）。また、SEBはブドウ球菌の食中毒を引き起こす腸管内毒素でもあるため、生体内に投与したときのSEBの病原性の問題があるが、かかる毒性を回避するため、特開平9-110704では、高度に精製したSEBを病原性を与えない投与量で連続的に長期間経口投与することにより生体に病原性を与えることなく免疫寛容のみ有効に誘導させている。

SEBの毒性を回避する他の方法としては、カップラー及びマーラックらが特表平8-500328で開示している「突然変異したスーパー抗原の保護作用」があり、彼らの発明の骨子は以下のものである。SEBの突然変異体を調製し精製した後、ヒトのクラスII MHC分子及びTCRに結合可能なSEB突然変異体を選択した。その後、突然変異していないSEBと区別できないほどにクラスII陽性細胞に結合し、T細胞の増殖を刺激しないSEB突然変異体をSEBに暴露する前に動物に注射するとSEBの毒性作用に対して完全な防御を示した。

特表平8-500328の開示がもたらす特に重要な知見は、毒性除去に関わるSEBの構造研究である。SEBの3次元構造はスワミノサンら（Nature, Vol. 359, p. 801 (1992)）によって報告されている。SEB分子は2つのドメインから構成され、最初のドメインは残基1-120よりなり、2番目は残基127-239よりなる。また、SEBのN-末端部分にはクラスII MHC分子結合及び／またはTCR結合に影響を与える3つの領域（領域1（残基9-23）、領域2（残基41-53）および領域3（残基60-61））が同定されている。

発明の開示

上述の知見に着目し、本発明者らは、本来のSEBの有する毒性を軽減し免疫異常性疾患の予防・治療に効果を発揮し得るSEB改変体及びそれらの誘導体を本態とする新規な免疫異常性疾患の予防・治療用薬剤を提供する本発明を完成した。

すなわち、本発明は、天然型の黄色ブドウ球菌腸管内毒素B(SEB)のアミノ酸配列において少なくとも1のアミノ酸残基の置換を有するSEB改変体または

その誘導体を有効成分として含有する免疫異常性疾患予防・治療用剤であって、該改変体または該誘導体は、T細胞レセプター（TCR）の特異的V β 成分と相互作用するが、天然型SEBや組換え野生型SEBによって惹起される特定のV β 成分をもつT細胞の除去を誘導することなくSEBに対する免疫学的応答性のみを低下させるT細胞活性化の抑制作用を有するものであることを特徴とする、免疫異常性疾患予防・治療用剤を提供するものである。

本発明の第一の態様において、SEB改変体またはその誘導体は、部位特異的突然変異により、天然型SEBを基準にして9位のアミノ酸がアスパラギン酸以外のタンパク質構成アミノ酸、好ましくはアスパラギンで置換されているもの、またはその誘導体である。

本発明の第二の態様において、SEB改変体またはその誘導体は、部位特異的突然変異により、天然型SEBを基準にして23位のアミノ酸がアスパラギン以外のタンパク質構成アミノ酸、好ましくはチロシン、アスパラギン酸、イソロイシンまたはリジンで置換されているもの、またはその誘導体である。

本発明の第三の態様において、SEB改変体またはその誘導体は、部位特異的突然変異により、天然型SEBを基準にして41位のアミノ酸がイソロイシン以外のタンパク質構成アミノ酸、好ましくはアルギニンもしくはスレオニンで置換されており、かつ44位のアミノ酸がフェニルアラニン以外のタンパク質構成アミノ酸、好ましくはバリンに置換されているかもしくは45位のアミノ酸がロイシン以外のタンパク質構成アミノ酸、好ましくはバリンに置換されているもの、またはその誘導体である。

本発明の第四の態様において、SEB改変体またはその誘導体は、部位特異的突然変異により、天然型SEBを基準にして44位のアミノ酸がフェニルアラニン以外のタンパク質構成アミノ酸、好ましくはセリンに置換されているもの、またはその誘導体である。

図面の簡単な説明

図1は、本発明のSEB改変体調製時のアミノ酸置換に用いたそれぞれの改変体に応じたPCRプライマーの塩基配列を示す図である。

図2は、本願発明のSEB改変体調製時のアミノ酸置換に用いたそれぞれの改

変体に応じたPCRプライマーの塩基配列を示す図である。

図3は、野性型SEB及びSEB改変体刺激によるヒト末梢血単核球(PBMC)のTNF- α 産生量を示す図である。

図4は、SEB改変体によるT細胞抑制活性を示す図である。

5 図5は、コラーゲン誘導関節炎に対するSEB改変体の経口投与による治療効果を示した図であり、有効であった投与群のものである。縦軸は被験マウスの重症度、横軸は発症してからの経過日数を示す。

図6は、コラーゲン誘導関節炎に対するSEB改変体の経口投与による治療効果を示した図であり、無効であった投与群のものである。縦軸は被験マウスの重症度、横軸は発症してからの経過日数を示す。

10 図7は、コラーゲン誘導関節炎に対するSEB改変体の経口投与による予防的治療効果を示した図である。縦軸は被験マウスの重症度、横軸はSEB改変体の投与開始からの経過日数を示す。

発明を実施するための最良の形態

15 本発明では、SEB改変体の調製に際し、TCRとの結合に係る部位には改変を施すことなく、クラスII MHC分子への結合に影響を与えるものについて鋭意検討を重ねた。スーパー抗原とクラスII MHCとの結合は、スーパー抗原によるT細胞活性化に必須であるため、直接TCR結合部位に影響を与えずともクラスII MHC分子への結合を抑制することによりT細胞のSEBに対する応答性

20 性が低下する可能性(アナジーの誘導)が期待されたからである。

9-23のアミノ酸残基として定義される領域1では、特に重要なクラスII MHC分子への結合を妨害する23位アスパラギンの改変(N23D、N23K、N23Y、N23I)について重点的に検討した。また、9位アスパラギン酸(D9N)及び17位フェニルアラニン(F17S)の改変についても同様に調べた。なお、本明細書に用いられる改変に係る表記は、アミノ酸残基位置の数字の前に改変前のアミノ酸名を、後に改変後のアミノ酸名を表記したものであり、例えば「N23D」の場合、N末端から23番目(23位)のN(Asn:アスパラギン)をD(Asp:アスパラギン酸)に置換した改変体を意味する。

25

残基40-53で定義される領域2は、全ての黄色ブドウ球菌の腸管内毒素に

においてクラス I I MHC 分子への結合を仲介するのに重要である。ここで 4 1 位、4 4 位、4 5 位及び 5 3 位の変異について検討した。これらの残基はクラス I I MHC 分子への結合に特異的である。残基 4 1、4 4、4 5、5 3 位、さらに 5 9 位に点突然変異（部位特異的突然変異）を導入し改変体を作製した。即ち、I 4 1 T L 4 5 V、I 4 1 R F 4 4 V、F 4 4 S、F 4 4 L I 5 3 N、F 4 4 L I 5 3 N G 5 9 W である。

上述の S E B 改変体について後述の方法でその安全性と有効性について検討した結果、以下の態様の S E B 改変体が、慢性関節リウマチ等の免疫異常性疾患に対する新規な予防・治療用薬剤の本態として安全で、かつ良好な機能を発揮し得ることを確認した。

①天然型 S E B を基準にして 9 位のアミノ酸がアスパラギン酸以外のタンパク質構成アミノ酸、とりわけアスパラギンで置換されている S E B 改変体またはその誘導体。

②天然型 S E B を基準にして 2 3 位のアミノ酸がアスパラギン以外のタンパク質構成アミノ酸、とりわけチロシン、アスパラギン酸、イソロイシンまたはリジンで置換されている S E B 改変体またはその誘導体。

③天然型 S E B を基準にして 4 1 位のアミノ酸がイソロイシン以外のタンパク質構成アミノ酸、とりわけアルギニンもしくはスレオニンで置換されており、かつ 4 4 位のアミノ酸がフェニルアラニン以外のタンパク質構成アミノ酸、とりわけバリンに置換されているかもしくは 4 5 位のアミノ酸がロイシン以外のタンパク質構成アミノ酸、とりわけバリンに置換されている S E B 改変体またはその誘導体。

④天然型 S E B を基準にして 4 4 位のアミノ酸がフェニルアラニン以外のタンパク質構成アミノ酸、とりわけセリンに置換されている S E B 改変体またはその誘導体。

さらに、これらの S E B 改変体の本態とする薬剤において、とりわけ、経口投与ルートでの投与形態が驚くべき効果をもたらすことを見出した。

まず S E B 改変体の毒性低減について体重減少誘発を指標として検討した。体重減少の評価は B A L B / c マウスを用いて行なった。含まれるエンドトキシン

を実験に影響を与えない濃度に除去したSEB300 μ gをPBS（リン酸緩衝化生理食塩水）に溶解し、マウスに腹腔内投与し、翌日より各個体の体重測定を行なった。結果は、野生型SEB及びD9Nでは7～9%の体重減少が投与後3日まで認められたが、残り全ての改変体では体重減少は認められなかった。

5 さらに、本発明者らはこれら改変体について、D-ガラクトサミン誘導致死毒性の有無について検討した。D-ガラクトサミンを投与するとSEBに対するマウスの感受性が著しく上昇し、雌のBALB/cマウスに投与した場合LD50が2 μ g/マウスまで低下し、20 μ g/マウスでは100%死亡することをMiethke T. らが報告している（J. Exp. Med., vol. 175, p. 91-98 (1992)）。

10 本発明者らは、この実験系を用いて改変体の致死毒性の有無について検討した。その結果、野生型とD9Nでは48時間後の死亡率がそれぞれ9/10、8/10であったのに対して、I41T L45Vが3/10、I41R F44Vが1/10、F44Sが0/10、F44L I53Nが0/10、F44L I53Nが1/10、そしてF44L I53N G59Wが0/10であり、これらの改変体では致死毒性は著しく低減されていることが判明した。これは、特表平8-500328で開示された毒性低減のみならず、致死毒性も除去できることを明確に示している。

20 ところで、免疫異常性疾患の予防・治療用剤としての可能性が期待されるSEBであるが、この物質そのものが免疫異常性疾患の発症に関与しているとの報告がある（Omata S. et.al., Cellular Immunol., Vol. 179, p. 138-145 (1997)）。そこで、SEBそのもの及び本発明のSEB改変体の免疫異常性疾患発症との関連について、ヒトの慢性関節リウマチのモデルであるコラーゲン誘導関節炎（collagen-induced arthritis; 以下、CIAと呼称することがあ
25 る）の系を用いて検討した。コラーゲンを投与して関節炎を誘導したマウスに、天然型SEB及び本発明によって提供される代表的なSEB改変体を追加投与すると、天然型SEBを投与されたマウス群では関節炎の発症率が高度に高く、その重症度も高度であって、発症とSEBとの関連が否定できないデータが得られたのに対して、SEB改変体の投与では重篤な発症を生じることはなかった。

SEBによるいくつかの毒性はSEBによって刺激された白血球が産生するモノカイン、とくに腫瘍壊死因子- α (TNF- α) に起因すると考えられる。事実、ヒトの末梢血リンパ球にSEBを反応させると多量のTNF- α が産生される。しかしながら、SEB改変体によるTNF- α 産生は著しく少なく、特にN
5 23Yの刺激活性は最も低かった。

このように、SEB改変体は増殖あるいはサイトカイン産生などの刺激活性が低下していた。この活性低下がインビボにおけるマウスの致死毒性の軽減や、関節炎惹起能の失活などと密接にかかわるものと推察された。しかしながら興味深いことに、SEB改変体は上述のTリンパ球刺激活性は著しく低下しているものの、逆に、Tリンパ球の活性化を抑制する活性が認められた。T細胞を抗原提示細胞存在下で抗原で刺激した場合、T細胞は増殖したりガンマーインターフェロン (γ -IFN) 等のサイトカインを産生するが、本系にSEB改変体を加えるとこれらの反応が抑制された。すなわち、SEBを改変することによって、単に天然型SEBの有する毒性が軽減されるだけでなく、T細胞の活性化反応を抑制
10 するという天然型SEBにはみられない作用が新たに生じることがわかった。

このT細胞活性化の抑制効果はインビボでも認められた。まず、前述の実験系で関節炎の発症に深く関与する天然型SEBの投与に先立ち、本発明のSEB改変体を投与しておく、と、重篤な関節炎の発症を防御し得るという、SEB改変体投与の優れた効果を支持する結果が得られた。

本発明のこれらSEB改変体について経口投与による自己免疫疾患治療薬への応用の可能性について、コラーゲン誘導関節炎 (CIA) の系で検討した。その結果、野生型、I41T L45V、I41R F44V、F44L I53N
20 G59W、F44S、N23Y、N23I、N23Dは関節炎の増悪を抑制することが判明し、有効性が保たれていることが確認された。とりわけ、N23Yは
25 改変体の中でも最も強くCIAを抑制した。

従って、本発明によってもたらされるSEB改変体を本態とする薬剤は、従来のものと比べて毒性が低く、且つT細胞の抑制活性に基づいたより有効性の高い慢性関節リウマチの予防・治療用剤、特に経口投与剤として利用可能である。また、特開平9-110704で開示される天然型SEBで示されているような炎

症性腸疾患に対する発症予防効果も期待できる。

本願発明の免疫異常性疾患の予防・治療用経口投与剤は、その本態である S E B 改変体を他の投与形態の薬剤に比べて極めて少量含有することを特徴とする。これら S E B 改変体は S E B と同様に S E B 結合性の V β T C R T 細胞亜集団に特異的に弱いトレランスを誘導するが、一方で、経口投与した場合、炎症性の T 細胞の作用を抑制する働きを有している。

本発明に使用される S E B 改変体を調製する方法は特に限定されることはないが、遺伝子組み換え技術によって得られる S E B 産生細胞より分離する方法によって調製することができる。

例えば、本発明の薬剤の本態となる S E B 改変体の基本となる野生型 S E B (黄色ブドウ球菌に由来する S E B と同じアミノ酸配列を有する遺伝子組換え技術に基づいて調製された S E B) は、概略以下の方法で調製する。

S E B の染色体 DNA は公知であるので (Ranelli D.M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol. 82, p. 5850~(1985))、DNA 合成機等を用いて 5' センスプライマー及び 3' アンチセンスプライマーを合成することができる。該プライマーと市販されている S E B の DNA ライブラリーに存する染色体 DNA によるプラークハイブリダイゼーションによりプラークを採取し、さらにセンスのプライマーを用いて P C R を行ない、得られたバンドから DNA を抽出する。そして、好適なクローニングベクターに抽出された DNA を挿入してクローニングする。

クローニングされた S E B をコードする遺伝子を S a c I、H i n d I I I、E c o R I、B a m H I、X b a I、S a l I 及び P s t I 等の制限酵素で切断し、同じく制限酵素 X m n I、H i n d I I I、E c o R I、B a m H I、X b a I、S a l I 及び P s t I 等で切断したベクターに組み込むことによって組換え体 DNA を得る (Sambrook ら、Molecular Cloning、第 2 版、第 9 章、1989 年、New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press)。ベクターとしては、分泌発現用ベクター p T r c 9 9 A 等が好適に用いられ得る。

得られた組換え体 DNA を適当な宿主、例えば大腸菌に組み込むことにより、形質転換体を得ることができる。当該形質転換体を常法により培養した後、培養

終了後に菌体を採取し、常法により菌体を破砕し懸濁液より所望の野生型 S E B を得ることができる。なお、条件によっては培養上清中に好適に野生型 S E B が分泌されている場合があり、この場合、培養上清が調製の出発原料となり得る。出発原料を、例えば、抗 S E B 単クローン抗体を吸着体に結合させた免疫アフィニティークロマトグラフィー等の精製手段により精製する。なお、各種試験に用いられる最終調剤の緩衝液は、トリス塩酸緩衝液、リン酸緩衝液等を用いることが好ましい。

本発明の S E B 改変体の調製は前述の野生型 S E B の調製に準じて行うことができる。ただし、S E B の X 線構造解析データに基づく分析によりクラス I I M H C 分子との結合部位を解析し、アミノ酸の特定の改変部位を決定して好適なプライマーを調製し、P C R による点突然変異の操作を加えることが必須の要件となる。

調製された野生型 S E B 及び S E B 改変体を最大限に維持するためには、新鮮であるか、4℃で保存する場合は保存後約 5 日以内のものが好ましい。あるいは、本発明の S E B 改変体は、ゼラチン、塩、糖、糖アルコールまたはアミノ酸等の好適な環境で保存することができる。

また、本発明では有効成分としての S E B 改変体もしくはその誘導体と公知の適当な賦形剤を組み合わせ、公知の方法で本発明の免疫異常性疾患予防・治療剤とすることができる。本薬剤の最終的な剤型については、経口投与用の薬剤である限り特別の制約はなく粉末（固形）状、溶液状あるいはシロップ状のものが考慮され得る。例えば、S E B 改変体もしくはその誘導体を適当な賦形剤、例えば炭水化物、糖、糖アルコールおよびアミノ酸等と共に凍結乾燥し固形状としたものまたは S E B 改変体もしくはその誘導体を生理食塩水および許容し得る張度のイオン強度を有する適当な緩衝液中に溶解した液状製剤等は好適な態様である。また、本態となる S E B 改変体もしくはその誘導体を市販の飲料水に溶解し経口的に摂取することも考えられ得る。薬剤中の含量については、1 回の投与当たり $0.05 \mu\text{g} \sim 50 \text{mg}$ ($0.001 \sim 1,000 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重)、好ましくは $0.5 \mu\text{g} \sim 0.5 \text{mg}$ ($0.01 \sim 10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重) の S E B 改変体もしくはその誘導体を含む薬剤が好適である。

本発明のS E B改変体もしくはその誘導体を本態とする免疫異常性疾患予防・治療用剤の有効投与量は、例えば投与対象者の年齢、症状および重症度などにより変動し、最終的には医師の意図により変動するものであるが、例えばS E B改変体に換算した場合、一般に成人1日当たり0.05～50,000 μ gであり、
5 好ましくは0.5～500 μ gを1～2回に分けて経口的に投与するのがよい。
また、場合により例えばアザチオプリン、シクロフォスファミド、またTNF α 抗体等の高分子の抗炎症剤等の他の薬剤と併用することも可能である。

本発明のS E B改変体含有免疫異常性疾患予防・治療用剤が適用できる免疫異常性疾患としては、慢性関節リウマチや潰瘍性大腸炎等の自己免疫疾患が主たる
10 適用疾患として挙げられるが、自己免疫疾患以外にも例えば骨髄移植後の移植片対宿主病やI型、II型、III型アレルギー性疾患にも適用できる。

また、本発明のS E B改変体の「誘導体」とは、上記少なくとも1のアミノ酸残基の置換を有するS E B改変体がさらにアミノ酸修飾を受けたものをいい、上記特定の
15 アミノ酸以外に天然型S E Bのアミノ酸配列中のいずれかのアミノ酸残基がさらに置換、欠失、挿入等されたもので、本発明のS E B改変体と同等の活性を有するものはいずれも本発明に包含される。

産業上の利用可能性

本発明により、従来より強く望まれていた慢性関節リウマチ等の自己免疫疾患をはじめとする免疫異常性疾患に対する新規な予防・治療用薬剤を提供することが可能となる。
20

実施例

以下に、調製例及び実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに何ら限定されるものではない。

調製例 1 (組換えS E B改変体の作製と発現)

25 1-1 S E B遺伝子のクローニング

CLONOTEC社よりStaphylococcus aureus enterotoxin A+B+DのDNAライブラリーを購入し、ブランクハイブリダイゼーション法を行なった。プローブとして、アンチセンスの合成DNAあるいはPCR断片を用いた。プライマーは以後のクローニング操作を容易にするために両端にS a l I切断部位を付加した。

上記プライマーと結合したプラークを採取し、さらにセンスのプライマーを用いてPCRを行ない、得られたバンドからDNAを抽出し、PCR-IIベクター (Invitrogen社) にクローニングした。上記ハイブリダイゼーションに用いたプライマーを表1に示す。

5 表1

アンチセンス: 5'-AAG TCG ACA ATA TTA GAA AAG GCA GGT ACT-3'

(配列番号1) Sal I

センス: 5'-ATG TCG ACT TAA TTG AAT ATT TAA GAT TAT-3'

(配列番号2) Sal I

10 その後、オートシーケンサーを使用して、DNAの塩基配列を確認した。得られたSEB遺伝子はプロモーター領域 (SEB-Pro) を含んでいたもので、プロモーター領域を含まないSEB遺伝子を得るために更に、表2に記載のプライマーを用いてPCRを行ない、得られたDNA断片をPCR-IIベクターにクローニングした。

15 表2

センス: 5'- AAG TCG ACA AAA AAT GTA TAA GAG ATT ATT-3'

(配列番号3) Sal I

アンチセンス: 5'- AAG TCG ACT TTC ACT TTT TCT TTG TCG TAA-3'

(配列番号4) Sal I

20 得られたSEB遺伝子のDNA塩基配列は、オートシーケンサーを用いて決定したが、上記のようにして得られたSEB遺伝子には突然変異は含まれていなかった。プロモーター領域を含まないSEB遺伝子を、Sal Iで切断し、同じ切断部位を持つ分泌発現用ベクターpTrc99A (Pharmacia Biotech社) にクローニングし、正常な方向に挿入されているものを使用して、IPTGを用いた誘導を行ない、SEBが分泌発現されることを確認した。

25

1-2 ポリメラーゼチェーン反応 (PCR)

本実施例では、PCRはSaikiら (Science vol., 239, p. 487(1988)) の報告に従い、TaqポリメラーゼとPerkin Elmer Cetus (Norwalk, CT, USA) のDNAサーマルサイクラーを用いて行なった。2本鎖テンプレートDNAを変性解離さ

せるための1分間の変性工程(94℃)、プライマーとテンプレートを会合させるための2分間のアニーリング工程(55℃)及び合成のための2分間の延長工程(72℃)を30~35サイクル行なった。テンプレート濃度は1~10Mであり、オリゴヌクレオチドプライマー濃度は1mMとした。dNTPの濃度は200mMであるが、突然変異を導入する場合は1つのdNTP濃度を20mMに低下させた。

1-3 組換えSEB改変体の作製と発現

SEB改変体は、アミノ酸置換導入を行なったものののみ組換え発現した。

Marrack P. et. al. (J. Exp. Med., Vol., 171, p. 445 (1990)) の報告に基づき、MHCクラスII分子に対する結合力に影響を与える領域を改変した。表3にアミノ酸置換の導入部位について示す。

表3

	改変位置	変化	呼称
	D 9	Asn→Asp	D9N
15	F 17	Phe→Ser	F17S
	N 23	Asn→Asp	N23D
	N 23	Asn→Tyr	N23Y
	N 23	Asn→Ile	N23I
	N 23	Asn→Lys	N23K
20	D 9, N 23	Asp→Asn, Asn→Asp	D9N N23D
	F 44	Phe→Ser	F44S
	F 44, I 53	Phe→Leu, Ile→Asn	F44L I53N
	F 44, I 53, G 59	Phe→Leu, Ile→Asn, Gly→Trp	F44L I53N G59W
	I 41, F 44	Ile→Arg, Phe→Val	I41R F44V
25	I 41, L 45	Ile→Thr, Leu→Val	I41T L45V

1-4 アミノ酸置換の導入

PCR II ベクターに挿入したSEB-Pro遺伝子を鋳型DNAとして、5'末端にSfiI部位を、3'末端にNotI部位をPCRを用いて付加した。得られたDNA断片をpTrc99Ape1Bベクターに挿入し、塩基配列をシー

ケンシングして確認した。各SEB改変体のアミノ酸置換導入位置の遺伝子に本来のアミノ酸が目的とするアミノ酸に変換されるように塩基配列に変異を入れたPCR用プライマーをセンス側及びアンチセンス側それぞれ1本ずつ合成した。まずアンチセンス側のプライマー（D9N、N23I、N23Y、N23D、N23K、F17S、F17S N23D）-SEBを用いて先に作製し、SfiI部位付加用プライマーをセンスプライマーにしてPCRを行なった。

図1及び図2にそれぞれの改変体に用いたPCRプライマーの塩基配列を示す（配列番号5～19）。

次に、センスプライマーを用いて先に作製したNotI部位付加用プライマーをアンチセンスプライマーとしてPCRを行なった。得られた2本のDNA断片を使用してPCRを行ない、得られたDNA断片をpTrc99Aにクローニングした。その後SfiIとNotIで挿入されたベクターを処理して目的とするサイズのDNA断片に切断されるか調べ、切断されたものについてDNA塩基配列のシーケンシングを行ない変異の導入が正確になされているかどうか確認した。

1-5 SEB改変体の発現及び該改変体の調製

SEB改変体の発現はpTrc99Aベクターに挿入された改変体遺伝子を用いて行なった。遺伝子を組み込んだ大腸菌を4% CIRCLEGROW (BIO 101 Inc., Vista, CA, USA)、アンピシリン(50mg/ml)を溶かした培地で37℃18時間培養し、細胞を集めた後、さらに同じ培地に、O.D. 550nmが0.3～1.0になるように調整して浮遊し、2mMイソプロピルーB-D(ー)ーチオガラクトピラノシド(IPTG)を加えて37℃で一晩振とうすることにより誘導を行なった。誘導後、遠心分離により宿主の大腸菌を除去し、0.45μmの濾過膜で濾過した。

このようにして調製した培養上清を、抗SEB単クローン抗体SA58-2-6IgGを固相化したSepharose 4Bカラムに通液し、含まれるSEB改変体を吸着させた。0.1M Tris HCl (pH 8.0)で洗浄したのち、4M MgCl₂で溶出した。溶出画分は、20倍容の生理食塩水に3回透析後、20倍容のPBSに2回透析した。今回調製したSEB改変体は全てこの単クローン抗体カラムで精製することが可能であった。

実施例 1 (マウスを用いた致死毒性試験)

Miethke T. らが報告しているように、天然型 S E B は通常はマウスに致死毒性をもたらさないが、これに D-ガラクトサミンを $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ で投与し、さらに $20 \mu\text{g}/\text{マウス}$ の S E B を投与静脈内若しくは腹腔内に投与することで、死亡することが知られている (J. Exp. Med., Vol., 175, p. 91-98 (1992))。

5 本実施例では予め D-ガラクトサミンを投与したマウスに引き続き S E B 及び S E B 改変体を投与して、これらが実際に死亡率を改善するものであるかどうかを調べた。

10 先ず、エンドトキシンに対する感受性を調べるため、BALB/c マウスに D-ガラクトサミン $20 \text{mg}/\text{マウス}$ を投与後、E. coli B4 株由来の LPS (リポ多糖) を静脈内投与して 24 時間後の死亡率を調べた。その結果、LPS 投与量が $1 \text{ng}/\text{マウス}$ 以下では死亡例は 0 であった (表 4)。

表 4

	<u>投与量</u>	<u>死亡個体数/全個体数</u>
15	$1 \mu\text{g}/\text{head}$	7/9
	$100 \text{ng}/\text{head}$	8/9
	$10 \text{ng}/\text{head}$	5/9
	$1 \text{ng}/\text{head}$	0/9
	$0.1 \text{ng}/\text{head}$	0/9

20 S E B 改変体標品中に含まれるエンドトキシンの量を最終投与量が $10 \text{ng}/\text{マウス}$ 以下になるように除去し、雄を使用して実験を行なった。雄では、D-ガラクトサミン投与後の S E B の致死毒性は $100 \mu\text{g}/\text{マウス}$ 以上を投与したときに発現されたので、S E B 改変体の投与量は $100 \mu\text{g}/\text{マウス}$ とした。表 5 に示すように、天然型 S E B、野生型 S E B 及び D9N-S E B ではマウスの死亡率は高く、致死毒性があることが示されたが、他の改変体では致死毒性は低減されていた。なお、ここでいう天然型 S E B とは黄色ブドウ球菌に由来する腸管内毒素を意味し、野生型 S E B は天然型 S E B とアミノ酸配列を同じくする遺伝子組換え技術に基づいて調製された S E B を意味する。

25

表 5

	S E B 改変体 (100 μ g/head)	死亡率 (合計死亡個体数 / 全個体数)	
		2 4 時間後	4 8 時間後
5	天然型	8 / 1 0	8 / 1 0
	野生型	7 / 1 0	9 / 1 0
	D9N	6 / 1 0	7 / 1 0
	I 41 T L 45 V	3 / 1 0	3 / 1 0
	I 41 R F 44 V	0 / 1 0	0 / 1 0
10	F 44 L I 53 N	0 / 9	0 / 9
	F 44 L I 53 N G 59 W	0 / 1 0	0 / 1 0
	F 44 S	0 / 1 0	0 / 1 0
	N 23 I	0 / 1 0	0 / 1 0
	N 23 D	0 / 1 0	0 / 1 0
15	N 23 Y	0 / 1 0	0 / 1 0
	N 23 K	0 / 1 0	0 / 1 0
	P B S	0 / 1 0	0 / 1 0

次に、雌の B A L B / c マウスを用いて実験を行なった。雌では D-ガラクトサミン 40 mg / マウスを投与したとき、S E B 20 μ g / マウスで高い致死毒性が認められた。天然型-S E B、野生型-S E B、D 9 N-S E B では高い死亡率となったが、その他の改変体では死亡率は低く、致死毒性が低減されていることが示された。

実施例 2 (S E B 及び S E B 改変体刺激によるヒト末梢血単核球 (P B M C) の T N F - α 産生の比較)

健康人末梢血よりリンパ球分離液 (Pharmacia) にて末梢血単核球 (P B M C) を採取し、 1×10^6 cells/ml になるように 10% F C S 含有 R P M I 1 6 4 0 培地に浮遊させた。100 ml の細胞浮遊液を 96 穴マイクロタイタープレート (Falcon) に加え、これにさらに 100 ml の S E B 及び S E B 改変体溶液を添加して 37 $^{\circ}$ C で 24 時間培養した。24 時間後に培養上清を回収し、上清中の T N F - α をヒト T N F - α 用エンザイムイムノアッセイキット

(Biosource) で定量した。図 3 にその結果を示す。SEB で PBMC を刺激した場合、多量の $\text{TNF-}\alpha$ が産生されたのに対し、SEB 改変体では $\text{TNF-}\alpha$ 産生は著しく低下していた。特に N23Y が最も低い値を示し、SEB に対する比活性は 1000 倍以下であった。

5 実施例 3 (SEB 改変体による T 細胞抑制活性)

SEB 改変体による T 細胞抑制活性を purified peptide derivative (PPD) 応答性マウス T 細胞株 PPD914 を用いて評価した。本 T 細胞株は $\text{V}\beta 8$ TCR 陽性であり、抗原である PPD のみならず、SEB にも反応することができる。 1×10^4 個の PPD914 をマイトマイシン処理した DBA/1 J 由来の脾臓細胞 5×10^5 個を 96 穴マイクロタイタープレート (Falcon) で培養し、 0.5 mg/ml の PPD を加えて刺激した。この系に SEB 改変体を 1 mg/ml で添加し、 37°C で 48 時間培養した。48 時間後に 0.5 mCi/well でトリチウムチミジンを加えて、さらに 16 時間追加培養し増殖反応を測定した。SEB 改変体による抑制活性は改変体非添加群と比較することにより評価した。結果を図 4 に示す。改変体 N23Y 及び F44S は抗原である PPD によって惹起される T 細胞の増殖応答を抑制した。

15 実施例 4 (コラーゲン誘導関節炎 (CIA) での SEB 改変体の安全性の評価)

コラーゲン誘導関節炎 (CIA) は、DBA/1 マウスに、ウシ II 型コラーゲンをフロイント完全アジュバントとともに、 $200 \mu\text{g}$ /マウスで皮内投与して誘導した。ウシ II 型コラーゲン投与より 21 日後に SEB、F44S または N23D を各々 $50 \mu\text{g}$ /マウスの投与量で腹腔内投与し、一週間後 (初回のコラーゲンの投与より 28 日後) に関節炎の発症率を比較した。表 6 に関節炎発症率と重症度について結果をまとめている。SEB を投与されたマウスでは強力な関節炎が 8 例中 5 匹に観察されたが、F44S または N23D の投与群のマウスには 1 例も関節炎は認められなかった。

表 6

	<u>1 次免疫</u>	<u>ブースター</u>	<u>発症率</u>	<u>重症度</u>
	コラーゲン	S E B	5 / 8	6.2
	コラーゲン	F 44 S	0 / 8	—
5	コラーゲン	N23D	0 / 8	—

実施例 5 (S E B 誘導性関節炎における S E B 改変体の予防効果)

実施例 4 と同様の方法で誘導した D B A / 1 マウスに、ウシ I I 型コラーゲン投与より 18 日後、F 44 S または N 23 D および対照としてリン酸緩衝液を各々 50 μ g / マウスの投与量で腹腔内投与した。さらに 3 日後に 50 μ g / マウスの S E B を腹腔内投与した。表 7 にリン酸緩衝液投与群では 8 例中 4 例 (50 % 発症率) のマウスに関節炎が認められたが、F 44 S または N 23 D を前投与することによって、発症率はそれぞれ 13 % 及び 25 % に抑制された。

表 7

	<u>1 次免疫</u>	<u>前処置</u>	<u>ブースター</u>	<u>発症率</u>	<u>重症度</u>
15	コラーゲン	P B S	S E B	4 / 8	6.5
	コラーゲン	F 44 S	S E B	1 / 8	5.0
	コラーゲン	N23D	S E B	2 / 8	2.5

実施例 6 (コラーゲン誘導関節炎 (C I A) での S E B 改変体の経口投与による治療効果)

実施例 4 と同様にして C I A を誘導した D B A / 1 マウスに、その後 21 日後にウシ I I 型コラーゲンをそのまま腹腔内投与するブースターを行なった。C I A の発症は関節炎スコアを測定し、重症度を比較し、実験開始時点での疾患の重症度を一定にそろえた。経口投与は、予め計算したマウス 1 日の飲水量を調べ平均飲水量を計算し、適度にバラツキがでるように群分けしたものをを用いた。

群分け後、S E B 改変体を自由飲水投与し、疾患の軽減を見る実験を開始した。毎週 1 回スコアを読み、重症度の推移を記録した。これらの結果を図 5 及び図 6 に示す。C I A の症状軽減、増悪抑制活性については、I 41R F 44V、I 41T L 45V、D 9N、N 23K、F 44S、N 23I 及び野生型 S E B について有効であった。各実験群の関節炎スコアを基に P B S (C I A 発症群) 投

与群と改変体投与群との間でウイルコクソン検定による有意差検定を行なった。その結果、上記の改変体投与群すべてにおいて、発症からの経過日数が25日～75日の間は0.05以下の危険率で有意であり、これらの改変体はCIAで症状軽減効果があることが判った。従って、毒性が低減されかつCIAでの有効性が保持されているSEB改変体の有効性が確認され、これらは副作用の極めて少ないヒトの慢性関節リウマチの治療用経口投与剤としての可能性が高いことを示唆している。

一方、D9N N23D、F17S E22D及びN23Y F208Lの投与群ではPBS投与群との比較で、ウイルコクソン検定において0.05の危険率で有意差はなかった。

実施例7 (コラーゲン誘導関節炎 (CIA) でのSEB改変体の経口投与による予防的治療効果)

実施例4と同様にして、200 μ gのウシII型コラーゲンをCFAに懸濁してDBA/Iマウスの尾部皮内に免疫した。免疫後20日後より生理食塩水に溶解したSEB改変体をマウスあたり0.5mg、隔日経口投与した。初回免疫後30日目に100 μ gのコラーゲンを腹腔内に投与した(ブースター)。経時的に関節炎を観察しスコア化し、SEB改変体のCIA抑制作用を評価した。図7に示すように、ブースターの10日前よりSEB改変体を投与する系においてもSEB改変体はCIAを抑制し、SEB改変体の関節炎に対する予防的治療効果が確認された。なかでもN23Yは最も効果的で、関節炎を顕著に軽減させた。

請 求 の 範 囲

1. 天然型の黄色ブドウ球菌腸管内毒素B (SEB) のアミノ酸配列において少なくとも1のアミノ酸残基の置換を有するSEB改変体またはその誘導体を有効成分として含有する免疫異常性疾患予防・治療用剤であって、該改変体または該誘導体は、T細胞レセプター (TCR) の特異的V β 成分と相互作用するが、天然型SEBや組換え野生型SEBによって惹起される特定のV β 成分をもつT細胞の除去を誘導することなくSEBに対する免疫学的応答性のみを低下させるT細胞活性化の抑制作用を有するものであることを特徴とする、免疫異常性疾患予防・治療用剤。

2. SEB改変体またはその誘導体が、天然型SEBを基準にして9位のアミノ酸がアスパラギン酸以外のタンパク質構成アミノ酸で置換されているもの、またはその誘導体である請求項1記載の免疫異常性疾患予防・治療用剤。

3. SEB改変体またはその誘導体が、天然型SEBを基準にして9位のアミノ酸がアスパラギンで置換されているもの、またはその誘導体である請求項2記載の免疫異常性疾患予防・治療用剤。

4. SEB改変体またはその誘導体が、天然型SEBを基準にして23位のアミノ酸がアスパラギン以外のタンパク質構成アミノ酸で置換されているもの、またはその誘導体である、請求項1記載の免疫異常性疾患予防・治療用剤。

5. SEB改変体またはその誘導体が、天然型SEBを基準にして23位のアミノ酸がチロシン、アスパラギン酸、イソロイシンまたはリジンで置換されているもの、またはその誘導体である、請求項4記載の免疫異常性疾患予防・治療用剤。

6. SEB改変体またはその誘導体が、天然型SEBを基準にして41位のアミノ酸がイソロイシン以外のタンパク質構成アミノ酸で置換されており、かつ44位のアミノ酸がフェニルアラニン以外のタンパク質構成アミノ酸に置換されているかもしくは45位のアミノ酸がロイシン以外のタンパク質構成アミノ酸に置換されているもの、またはその誘導体である、請求項1記載の免疫異常性疾患予防・治療用剤。

7. SEB改変体またはその誘導体が、天然型SEBを基準にして41位のア

ミノ酸がアルギニンもしくはスレオニンで置換されており、かつ44位のアミノ酸がバリンに置換されているかもしくは45位のアミノ酸がバリンに置換されているもの、またはその誘導体である、請求項6記載の免疫異常性疾患予防・治療用剤。

5 8. SEB改変体またはその誘導体が、天然型SEBを基準にして44位のアミノ酸がフェニルアラニン以外のタンパク質構成アミノ酸に置換されているもの、またはその誘導体である、請求項1記載の免疫異常性疾患予防・治療用剤。

9. SEB改変体またはその誘導体が、天然型SEBを基準にして44位のアミノ酸がセリンに置換されているもの、またはその誘導体である、請求項8記載
10 の免疫異常性疾患予防・治療用剤。

10. 経口投与用剤である請求項9記載の免疫異常性疾患予防・治療用剤。

11. 生理学的に許容しうるpH及び許容しうる強度のイオン強度を有する水溶液である請求項10記載の免疫異常性疾患予防・治療用剤。

12. 生理学的に許容しうる張度を溶液に与えるのに十分な量で、炭水化物、
15 糖、糖アルコールおよびアミノ酸よりなる群から選ばれる物質を含有する請求項11記載の免疫異常性疾患予防・治療用剤。

13. 慢性関節リウマチの予防・治療用剤である請求項1ないし12のいずれかに記載の免疫異常性疾患予防・治療用剤。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

1/7

図 1

D 9 N-S E B

アチセンス : CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG AGT CAA CCA GAT CCT
AAA CCA AAC GAG TTG CAC AAA TCG

N 23 I-S E B

アチセンス : CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG AGT CAA CCA GAT CCT
AAA CCA GAT GAG TTG CAC AAA TCG AGT AAA TTC ACT GGT TTG
ATG GAA ATT ATG AAA GTT TT

N 23 K-S E B

アチセンス : CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG AGT CAA CCA GAT CCT
AAA CCA GAT GAG TTG CAC AAA TCG AGT AAA TTC ACT GGT TTG
ATG GAA AAA ATG AAA GTT TT

N 23 Y-S E B

アチセンス : CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG AGT CAA CCA GAT CCT
AAA CCA GAT GAG TTG CAC AAA TCG AGT AAA TTC ACT GGT TTG
ATG GAA TAT ATG AAA GTT TT

N 23 D-S E B

アチセンス : CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG AGT CAA CCA GAT CCT
AAA CCA GAT GAG TTG CAC AAA TCG AGT AAA TTC ACT GGT TTG
ATG GAA GAT ATG AAA GTT TT

D 9 N N 23 D-S E B

アチセンス : CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG AGT CAA CCA GAT CCT
AAA CCA AAC GAG TTG CAC AAA TCG AGT AAA TTC ACT GGT TTG
ATG GAA GAT ATG AAA GTT TT

THIS PAGE BLANK (USPTO)

F 17 S-S E B

アンチセンス : CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG AGT CAA CCA GAT CCT
AAA CCA GAT GAG TTG CAC AAA TCG AGT AAA TCC ACT GGT TTG
ATG GAA

F 44 S-S E B

センス : AAA TCT ATA GAT CAA TCT CTA TAC TTT GAC TTA
アンチセンス : TAA GTC AAA GTA TAG AGA TTG ATC TAT AGA TTT

I 41 T L 45 V-S E B

センス : TCT ATA GAT CAA TTT GTA TAC TTT GAC TTA ATA
アンチセンス : TAT TAA GTC AAA GTA TAC AAA TTG ATC TAT AGA

I 41 R F 44 V-S E B

センス : ATA AAC GTT AAA TCT CGT GAT CAA GTT CTA TAC TTT GAC TTA
アンチセンス : TAA GTC AAA GTA TAG AAC TTG ATC ACG AGA TTT AAC GTT TAT

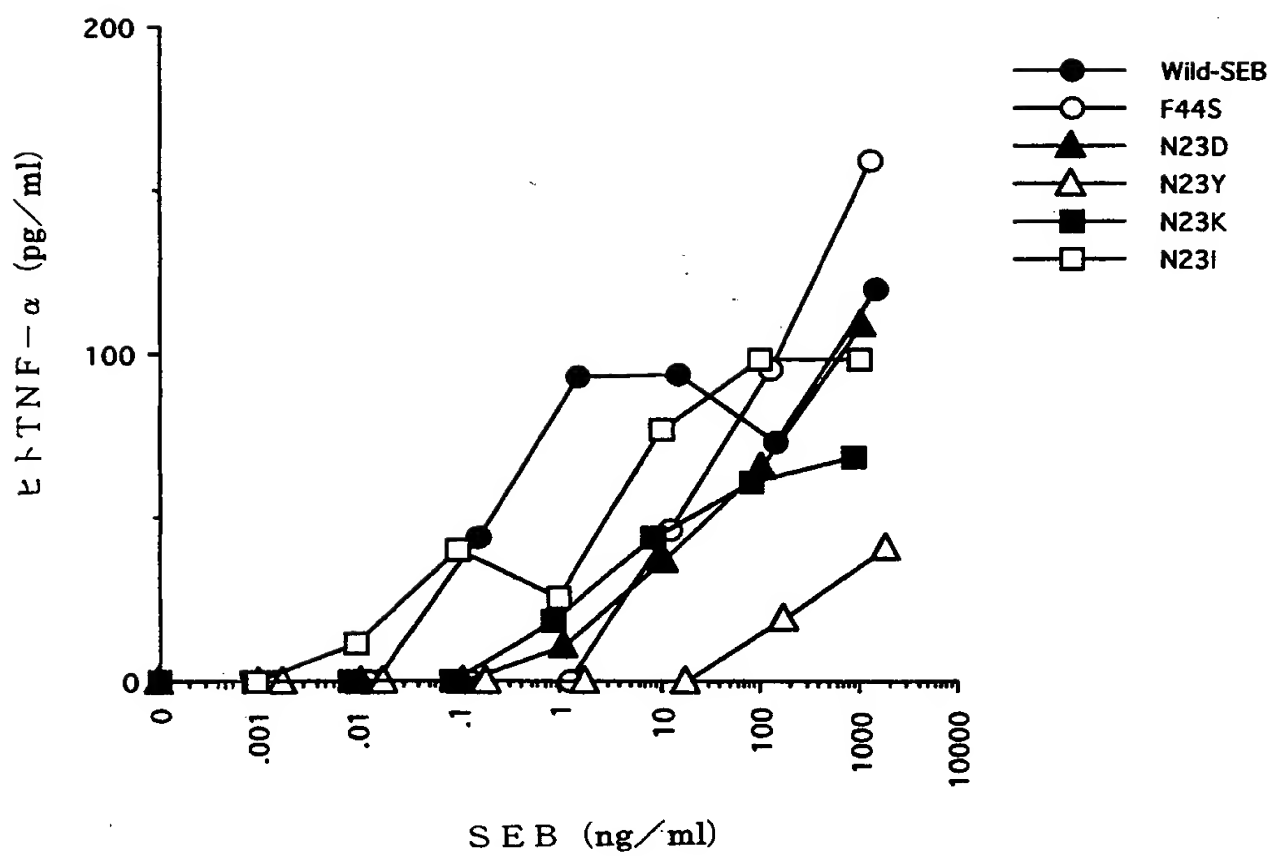
F 44 L I 53 N-S E B

センス : AAA TCT ATA GAT CAA CTG CTA TAC TTT GAC TTA ATA TAT TCT
AAC AAG GAC ACT AAG TTA
アンチセンス : TAA CTT AGT GTC CTT GTT AGA ATA TAT TAA GTC AAA GTA TAG
CAG TTG ATC TAT AGA TTT

THIS PAGE BLANK (USPTO)

3/7

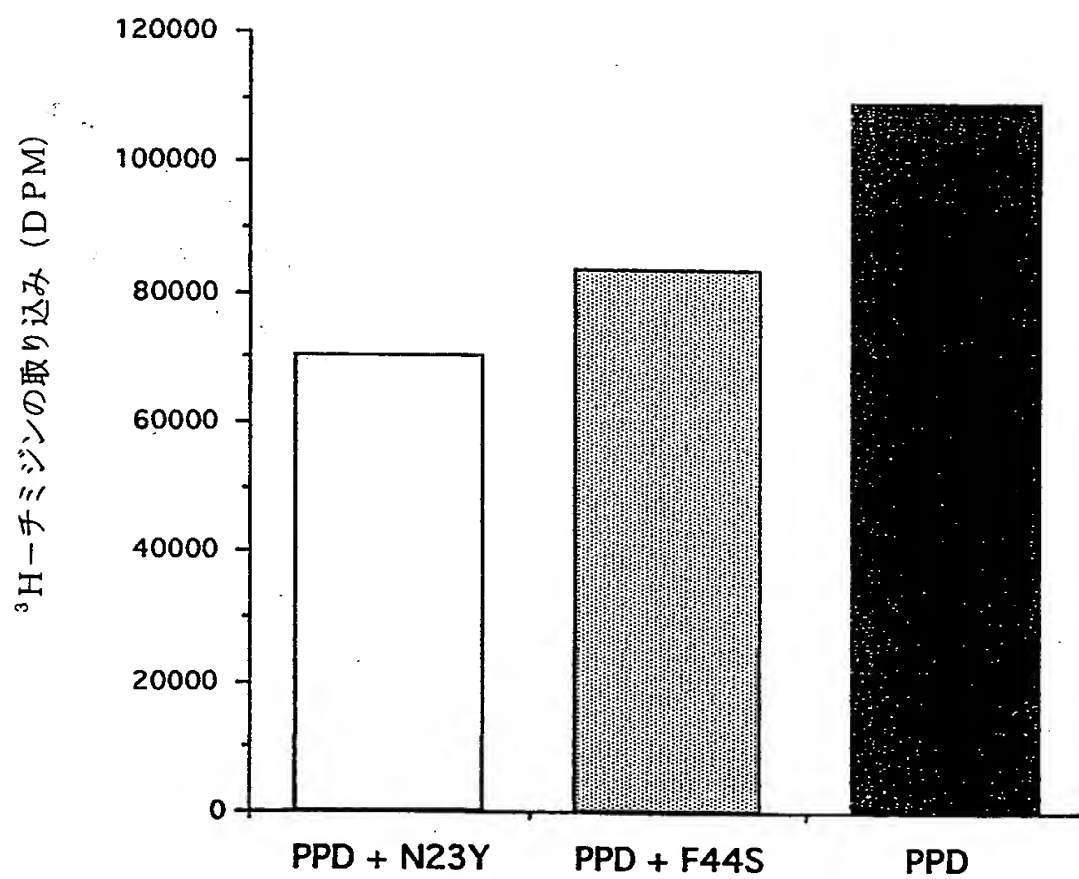
図 3



THIS PAGE BLANK (USPTO)

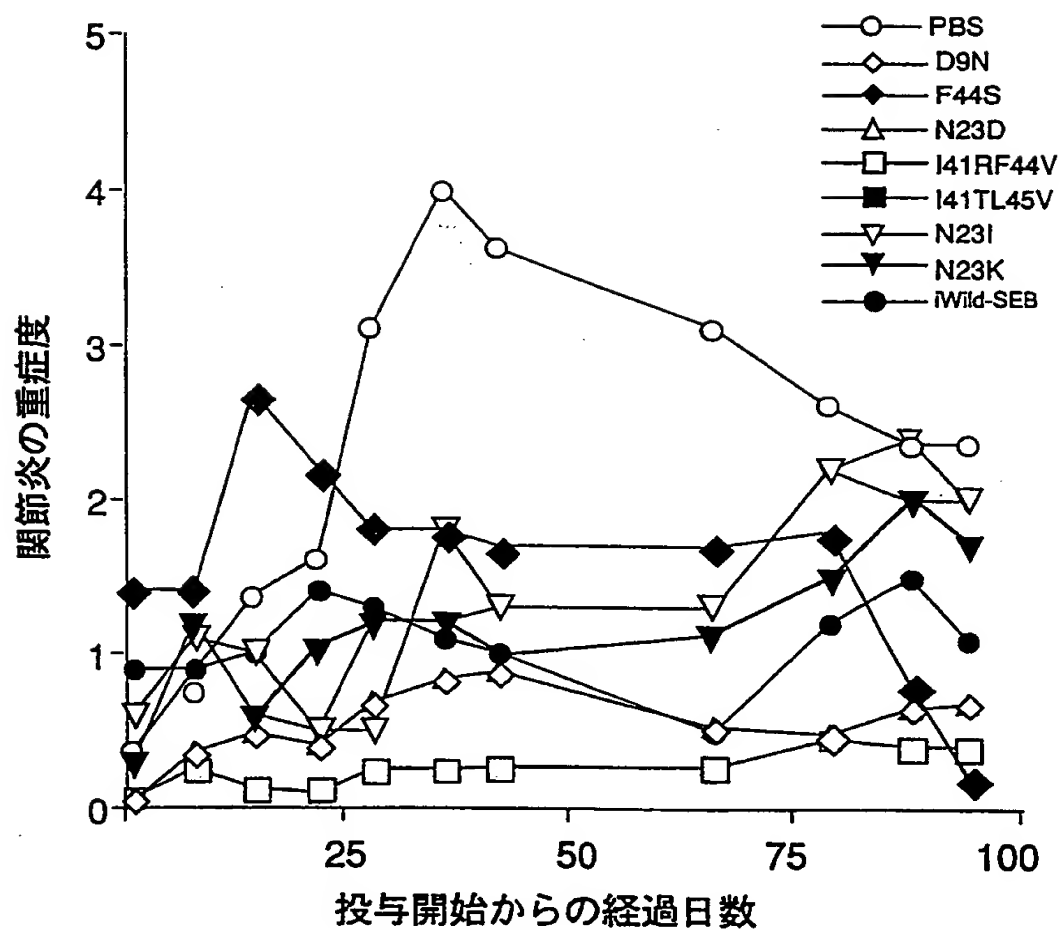
4/7

図 4



THIS PAGE BLANK (USPTO)

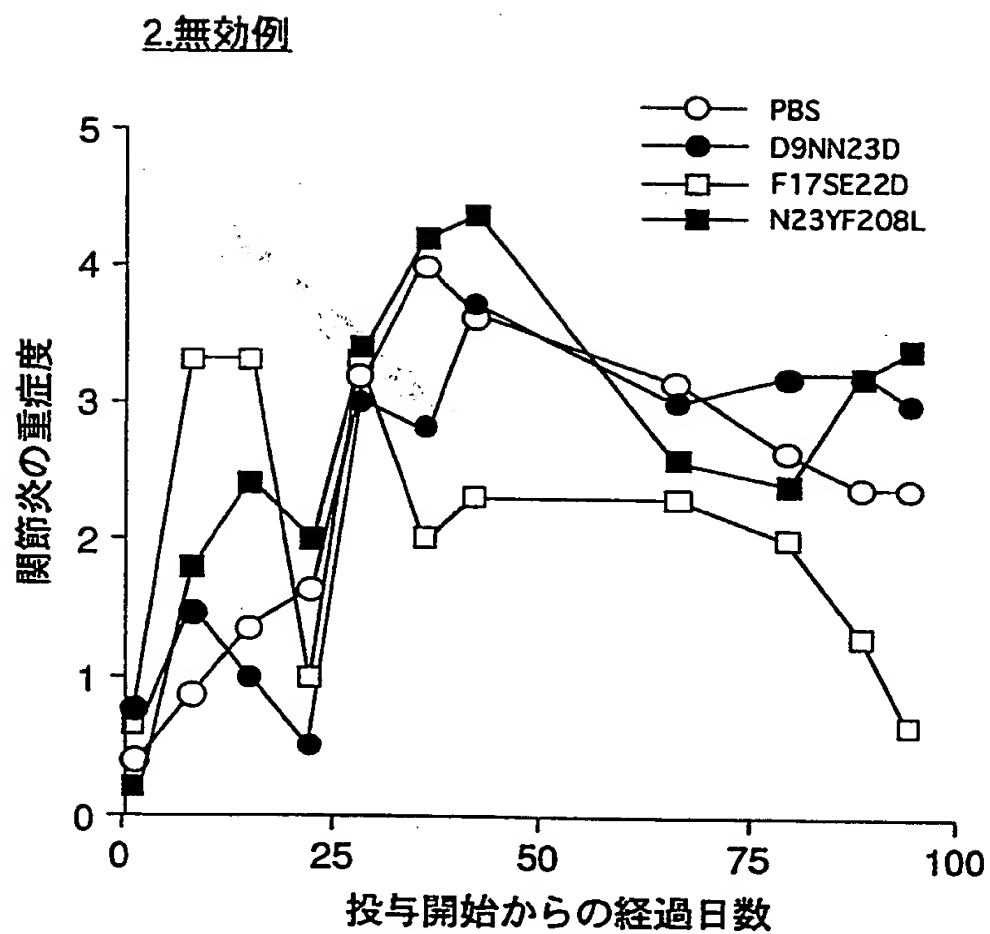
図 5

1. 有効例

THIS PAGE BLANK (USPTO)

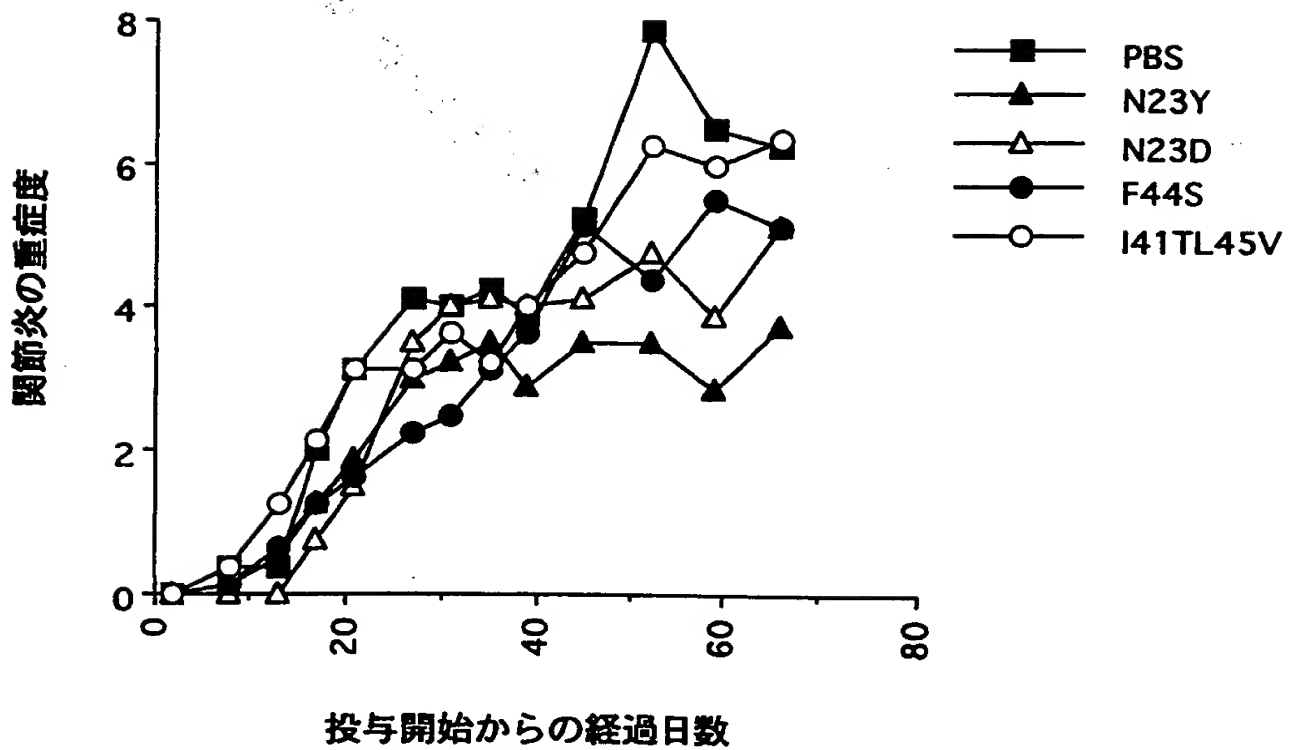
6/7

図 6



THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 7



THIS PAGE BLANK (USPTO)

SEQUENCE LISTING

<110> JURIDICAL FOUNDATION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH
INSTITUTE

<120> Novel Agent for Preventing and Treating Immunological Disorders

<130> 661202

<150> JP 10-50137

<151> 1998-02-15

<160> 19

<210> 1

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense primer designed for preparation of SEB variant by PCR
amplification

<400> 1

aagtcgacaa tattagaaaa ggcaggtact

30

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<220>

<223> Sense primer designed for preparation of SEB variant by PCR
amplification

<400> 2

atgtcgactt aattgaatat ttaagattat

30

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<220>

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<223> Sense primer designed for preparation of SEB variant by PCR amplification

<400> 3

aagtcgacaa aaaatgtata agagattatt

30

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<220>

<223> Antisense primer designed for preparation of SEB variant by PCR amplification

<400> 4

aagtcgactt tcactttttc tttgtcgtaa

30

<210> 5

<211> 66

<212> DNA

<220>

<223> Antisense primer designed for preparation of SEB variant by PCR amplification

<400> 5

ctcgcggccc agccggccat ggccgagagt caaccagatc ctaaaccaaa cgagttgcac

60

aaatcg

66

<210> 6

<211> 104

<212> DNA

<220>

<223> Antisense primer designed for preparation of SEB variant by PCR amplification

<400> 6

ctcgcggccc agccggccat ggccgagagt caaccagatc ctaaaccaga tgagttgcac

60

THIS PAGE BLANK (USPTO)

aaatcgagta aattcactgg tttgatggaa attatgaaag tttt

104

<210> 7

<211> 104

<212> DNA

<220>

<223> Antisense primer designed for preparation of SEB variant by PCR amplification

<400> 7

ctcgcggccc agccggccat ggccgagagt caaccagatc ctaaaccaga tgagttgcac 60

aaatcgagta aattcactgg tttgatggaa aaaatgaaag tttt

104

<210> 8

<211> 104

<212> DNA

<220>

<223> Antisense primer designed for preparation of SEB variant by PCR amplification

<400> 8

ctcgcggccc agccggccat ggccgagagt caaccagatc ctaaaccaga tgagttgcac 60

aaatcgagta aattcactgg tttgatggaa tatatgaaag tttt

104

<210> 9

<211> 104

<212> DNA

<220>

<223> Antisense primer designed for preparation of SEB variant by PCR amplification

<400> 9

ctcgcggccc agccggccat ggccgagagt caaccagatc ctaaaccaga tgagttgcac 60

aaatcgagta aattcactgg tttgatggaa gatatgaaag tttt

104

<210> 10

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<211> 104

<212> DNA

<220>

<223> Antisense primer designed for preparation of SEB variant by PCR amplification

<400> 10

```
ctcgcggccc agccggccat ggccgagagt caaccagatc ctaaaccaaa cgagttgcac      60
aaatcgagta aattcactgg tttgatggaa gatatgaaag tttt                        104
```

<210> 11

<211> 90

<212> DNA

<220>

<223> Antisense primer designed for preparation of SEB variant by PCR amplification

<400> 11

```
ctcgcggccc agccggccat ggccgagagt caaccagatc ctaaaccaga tgagttgcac      60
aaatcgagta aatccactgg tttgatggaa                                         90
```

<210> 12

<211> 33

<212> DNA

<220>

<223> Sense primer designed for preparation of SEB variant by PCR amplification

<400> 12

```
aaatctatag atcaatctct atactttgac tta                                     33
```

<210> 13

<211> 33

<212> DNA

<220>

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<223> Antisense primer designed for preparation of SEB variant by PCR amplification

<400> 13

taagtcaaag tatagagatt gatctataga ttt 33

<210> 14

<211> 33

<212> DNA

<220>

<223> Sense primer designed for preparation of SEB variant by PCR amplification

<400> 14

tctatagatc aatttgtata ctttgactta ata 33

<210> 15

<211> 33

<212> DNA

<220>

<223> Antisense primer designed for preparation of SEB variant by PCR amplification

<400> 15

tattaagtc aagtatacaa attgatctat aga 33

<210> 16

<211> 42

<212> DNA

<220>

<223> Sense primer designed for preparation of SEB variant by PCR amplification

<400> 16

ataaacgtta aatctcgtga tcaagttcta tactttgact ta 42

<210> 17

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<211> 42

<212> DNA

<220>

<223> Antisense primer designed for preparation of SEB variant by PCR amplification

<400> 17

taagtcaaag tatagaactt gatcacgaga tttaacgttt at 42

<210> 18

<211> 60

<212> DNA

<220>

<223> Sense primer designed for preparation of SEB variant by PCR amplification

<400> 18

aatctatag atcaactgct atactttgac ttaatatatt ctaacaagga cactaagtta 60

<210> 19

<211> 60

<212> DNA

<220>

<223> Antisense primer designed for preparation of SEB variant by PCR amplification

<400> 19

taacttagtg tccttgtag aatatattaa gtcaaagtat agcagttgat ctatagattt 60

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/00638

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ A61K39/09, 38/16 // C12N15/09, C07K14/315

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ A61K39/09, 38/16 // C12N15/09, C07K14/315

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN), DDBJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP, 9-110704, A (Juridical Foundation The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute), 28 April, 1997 (28. 04. 97), Reference as a whole (Family: none)	1-13
Y	JP, 8-500328, A (National Jewish Center for Immunology and Respiratory Medicine), 16 January, 1996 (16. 01. 96), Abstract ; Claims ; Title of the Invention ; page 16, line 23 to page 18, line 5 & WO, 93/14631, A1 & EP, 626805, A	1-13
Y	KAPPLER John W. et al., Mutations Defining Functional Regions of the Superantigen Staphylococcal Enterotoxin B, J. Exp. Med., 1992, Vol. 175, pp.387-396 Summary, Figure 2, Figure 4, Figure 5, Figure 6	1-13

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
13 April, 1999 (13. 04. 99)Date of mailing of the international search report
27 April, 1999 (27. 04. 99)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

P C T

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]


REC'D 01 MAY 2000

WIPO

PCT

出願人又は代理人 の書類記号 661202	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/00638	国際出願日 (日.月.年) 15.02.99	優先日 (日.月.年) 15.02.98
国際特許分類 (IPC) Int. Cl ⁷ A61K39/09, 38/16, A61P37/06, 29/00, 1/00 37/08//C12N15/09, C07K14/315		
出願人 (氏名又は名称) 財団法人化学及血清療法研究所		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。
- ☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☐ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 03.08.99	国際予備審査報告を作成した日 12.04.00	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 滝原 浩 	4C 9284
電話番号 03-3581-1101 内線 3452		

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT 14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- | | | |
|-------------------------------------|----------------|-----------------------|
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 _____ ページ、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 _____ ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 _____ ページ、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ 項、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ 項、 | PCT 19条の規定に基づき補正されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ 項、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ 項、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 _____ ページ/図、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 _____ ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 _____ ページ/図、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ ページ、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ ページ、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語
3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)

請求の範囲

1-13

有

請求の範囲

無

進歩性(IS)

請求の範囲

有

請求の範囲

1-13

無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲

1-13

有

請求の範囲

無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

文献1(JP, 9-110704, A(財団法人化学及血清療法研究所)28.4月.1997(28.04.97)ファミリーなし)の文献全体には、T細胞レセプター(TCR)の特異的V β 成分と相互作用する天然型の黄色ブドウ球菌腸管内毒素B(SEB)を有効成分として含有する免疫異常性疾患予防・治療用剤が記載されているが、請求の範囲1-12の発明である、SEBのアミノ酸配列において少なくとも1のアミノ酸残基の置換を有するSEB改変体またはその誘導体を含む、該誘導体が、天然型SEBや組換え野生型SEBによって惹起される特定のV β 成分をもつT細胞の除去を誘導することなくSEBに対する免疫学的応答性のみを低下させるT細胞活性化の抑制作用を有することは、文献1に記載されていない。しかし、文献2(JP, 8-500328, A(ナショナル ジューイッシュ センター フォア イミューノロジー アンド レスパトリー メディシン)16.1月.1996(16.01.96)&WO, 93/14631, A1&EP, 626805, A)の要約、特許請求の範囲、発明の要約、第16頁第23行-第18頁第5行には、SEBの毒性を回避して、治療に使用することが記載されており、文献3(KAPPLER John W. et al, Mutations Defining Functional Regions of the Superantigen Staphylococcal Enterotoxin B, J. Exp. Med., 1992, Vol.175, pp.387-396)のSummary, Figure 2, Figure 4, Figure 5, Figure 6には、サイトカイン産生を抑制、すなわち、SEBの毒性が回避されているSEBのアミノ酸配列において少なくとも1のアミノ酸残基の置換を有するSEB改変体またはその誘導体が記載されていることから、文献1記載の免疫異常性疾患予防・治療用剤において、文献2の記載に基づいて、SEBの毒性を回避させたものを使用すること、及び、SEBの毒性を回避させたものとして、例えば、文献3に記載のSEBの毒性が回避されているSEBのアミノ酸配列において少なくとも1のアミノ酸残基の置換を有するSEB改変体またはその誘導体を採用すること、さらに、その毒性の回避が、天然型SEBや組換え野生型SEBによって惹起される特定のV β 成分をもつT細胞の除去を誘導することなくSEBに対する免疫学的応答性のみを低下させるT細胞活性化の抑制作用によるものであることを確認することは、当業者が容易になし得ることである。

したがって、請求の範囲1-13は、進歩性を有しない。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

EP



国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 661202	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/00638	国際出願日 (日.月.年) 15.02.99	優先日 (日.月.年) 15.02.98
出願人(氏名又は名称) 財団法人化学及血清療法研究所		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ A61K39/09, 38/16//C12N15/09, C07K14/315

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ A61K39/09, 38/16//C12N15/09, C07K14/315

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), DDBJ

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP, 9-110704, A (財団法人化学及血清療法研究所) 28. 4月. 1997 (28. 04. 97) 文献全体 ファミリーなし	1-13
Y	JP, 8-500328, A (ナショナル ジューイッシュ セン ター フォア イミュノロジー アンド レスパトリイ メディ スン) 16. 1月. 1996 (16. 01. 96) 要約、特許請求 の範囲、発明の要約、第16頁第23行-第18頁第5行 &WO, 93/14631, A1&EP, 626805, A	1-13

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13. 04. 99

国際調査報告の発送日

27.04.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

河野下 浩一



4C

9284

電話番号 03-3581-1101 内線 6602

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	KAPPLER John W. et al, Mutations Defining Functional Regions of the Superantigen Staphylococcal Enterotoxin B, J. Exp. Med., 1992, Vo.175, pp.387-396 Summary, Figure 2, Figure 4, Figure 5, Figure 6	1 - 13

THIS PAGE BLANK (USPTO)